

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Monica JÖNSSON et al.

Application No.: 09/970,649

Filed: October 5, 2001

For: PARENTERALLY ADMISTRABLE
MICROPARTICLES



)
)
) Group Art Unit: 1619

)
) Examiner: (Unassigned)
)
)
)
)
)

RECEIVED
JAN 25 2002
TEC CENTER 1600/2900
Patent
09/16/19

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign Patent Application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Swedish Patent Application No. 0004218-4

Filed: November 16, 2000

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign Patent Application. Said prior foreign Patent Application is referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: January 22, 2002

By: Benton S. Duffett Jr.
Benton S. Duffett, Jr.
Registration No. 22,030

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

PRV

PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET

Patentavdelningen



Intyg Certificate

Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.



(71) Sökande Bioglan AB, Malmö SE
Applicant (s)

(21) Patentansökningsnummer 0004218-4
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 2000-11-16
Date of filing

Stockholm, 2001-10-25

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office

Kerstin Gerdén
Kerstin Gerdén

Avgift
Fee 170:-

RECEIVED
JAN 25 2002
TECH CENTER 1600/2900

PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET
SWEDEN

Postadress/Adress
Box 5055
S-102 42 STOCKHOLM

Telefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00

Telex
17978
PATOREG S

Telefax
+46 8 666 02 86
08-666 02 86

AWAPATENT AB

Kontor/Handläggare
Stockholm/Kjell Larsson/LFG

BIOGLAN THERAPEUTICS AB

Ansökningsnr Vår referens
SE-2009104

1

PARENTERALT ADMINISTRERBARA MIKROPARTIKLARTEKNISKT OMRÅDE

Föreliggande uppfinning ligger inom området galeniska formuleringar för administration av biologiskt aktiva substanser, närmare bestämt mikropartiklar för reglerad frisättning primärt avsedda för parenteral administration av biologiskt aktiva substanser, i synnerhet läkemedel. Mera speciellt hänför den sig till ett nytt framställningsförfarande för sådana partiklar innehållande en biologiskt aktiv substans samt till nya partiklar för reglerad frisättning, vilka kan erhållas därigenom.

BAKGRUND TILL UPPFINNINGEN

Många läkemedel måste administreras genom injektion, eftersom de antingen utsätts för nedbrytning eller absorberas i otillräcklig grad då de ges exempelvis oralt eller nasalt eller den rektala vägen. En läkemedelsberedning avsedd för parenteral användning måste uppfylla ett antal krav för att kunna godkännas av myndigheterna för användning på människor. Den måste sålunda vara biokompatibel och bionedbrytbar, och för samtliga använda substanser och deras nedbrytningsprodukter gäller att de inte får vara toxiska. Dessutom måste partikelformiga läkemedel avsedda för injektion vara tillräckligt små för att passera genom injektionsnålen, vilket företrädesvis innebär att de bör vara mindre än 200 μm . Läkemedlet bör ej brytas ned i någon större utsträckning i beredningen under framställning eller lagring av densamma eller efter administration och bör frisättas i en biologiskt aktiv form med reproducerbar kinetik.

En klass av polymerer som uppfyller kraven på biokompatibilitet och bionedbrytning till oskadliga slutprodukter är de linjära polyestrarna baserade på mjölksyra, glykolsyra och blandningar därav. I fortsättningen kommer

5 dessa polymerer också att gå under benämningen PLGA. PLGA bryts ned via esterhydrolys till mjölksyra och glykolsyra och har visat sig besitta utmärkt biokompatibilitet. Den ofarliga naturen hos PLGA kan dessutom exemplifieras av att åtskilliga parenterala beredningar för fördröjd frisättning baserade på dessa polymerer har godkänts av myndigheter, däribland US Food and Drug Administration.

Parenteralt administrerbara produkter för fördröjd frisättning på marknaden idag baserade på PLGA innefattar 10 Decapeptyl™ (Ibsen Biotech), Prostag SR™ (Lederle), Decapeptyl® Depot (Ferring) och Zoladex® (Zeneca). Läke-
medlen i dessa beredningar är alla peptider. Med andra ord består de av aminosyror kondenserade till en polymer med relativt låg polymerisationsgrad och de uppvisar ej 15 någon väldefinierad tredimensionell struktur. Detta möjliggör i sin tur vanligtvis användning av förhållandevis stränga betingelser under framställningen av dessa produkter. Exempelvis kan strängsprutning och efterföljande storleksreducering utnyttjas, vilka tekniker inte torde 20 vara tillåtna i samband med proteiner, eftersom dessa allmänt sett inte klarar så stränga betingelser.

Följaktligen föreligger det också behov av beredningar med reglerad frisättning för proteiner. Proteiner liknar peptider därigenom att de också består av aminosyror, 25 men molekylerna är större och flertalet proteiner är beroende av en väldefinierad tredimensionell struktur vad beträffar många av sina egenskaper, däribland biologisk aktivitet och immunogenicitet. Deras tredimensionella struktur kan förstöras relativt lätt, t.ex. av höga temperaturer, ytinducerad denaturering samt i många fall exponering för organiska lösningsmedel. En mycket allvarlig 30 nackdel i samband med användning av PLGA, som är ett utmärkt material i sig, för fördröjd frisättning av proteiner är därför behovet av användning av organiska lösningsmedel för upplösning av nämnda PLGA, med åtföljande 35 risk för att proteinets stabilitet påverkas negativt och att konformationsförändringar hos proteinet leder till en

immunologisk reaktion hos patienten, vilket kan ge både en förlust av den terapeutiska effekten genom bildning av hämmande antikroppar och toxiska biverkningar. Då det är synnerligen svårt att med säkerhet avgöra om ett komplext protein i alla delar har bibehållit sin tredimensionella struktur, är det av stor vikt att undvika att utsätta proteinet för betingelser som kan tänkas inducera konformationsförändringar.

Trots stora ansträngningar i syfte att modifiera PLGA-teknologin för undvikande av detta inneboende problem med proteininstabilitet under framställningsförloppet har utvecklingen inom detta område gått mycket långsamt, och huvudanledningen till detta är sannolikt att de tredimensionella strukturerna för flertalet proteiner är alltför känsliga för att motstå de använda tillverkningsbetingelserna och den kemiskt sura miljö som bildas vid nedbrytningen av PLGA-matriser. Den vetenskapliga litteraturen innehåller ett flertal beskrivningar av stabilitetsproblem vid tillverkningen av mikrosfärer av PLGA på grund av exponeringen för organiska lösningsmedel. Som ett exempel på den sura miljö som bildas vid nedbrytningen av PLGA-matriser har det nyligen visats att pH-värdet i en PLGA-mikrosfär med en diameter på cirka 40 μm visats sjunka till 1,5, vilket är fullt tillräckligt för att denaturera, eller på annat sätt skada, många terapeutiskt användbara proteiner (Fu et al, Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres. Pharmaceutical Research, Vol. 17, No 1, 2000, 100-106). I det fall mikrosfärerna har en större diameter kan pH-värdet förväntas sjunka ytterligare på grund av att de sura nedbrytningsprodukterna då får svårare att diffundera bort och att den autokatalytiska reaktionen intensifieras.

Den för närvarande vanligast använda tekniken för inneslutning av vattenlösliga substanser, såsom proteiner och peptider, är användning av multipelemulsionssystem. Läkemedelssubstansen löses i en vatten- eller buffertlös-

ning och blandas därefter med ett med vatten oblandbart organiskt lösningsmedel innehållande den upplöste polymeren. En emulsion bildas vilken har vattenfasen som inre fas. Olika typer av emulgeringsmedel och kraftig omblandning utnyttjas ofta för skapande av denna första emulsion. Denna emulsion överföres sedan, under omrörning, till en annan vätska, vanligtvis vatten, innehållande en annan polymer, t.ex. polyvinylalkohol, vilket ger en vatten/olja/vatten-trippelemulsion. Mikrosfärerna bringas därefter att hårdna eller härda på något sätt. Det vanligaste sättet är att utnyttja ett organiskt lösningsmedel med låg kokpunkt, typiskt diklormetan, och att avdriva lösningsmedlet. Om det organiska lösningsmedlet inte är helt oblandbart med vatten, kan en kontinuerlig extraktionsprocedur utnyttjas genom tillsats av mera vatten till trippelemulsionen. Ett antal variationer av denna allmänna procedur beskrivs också i litteraturen. I vissa fall blandas den primära emulsionen med en icke-vattenbaserad fas, t.ex. silikonolja. Fasta läkemedelsmaterial i stället för upplösta sådana kan också användas.

PLGA-mikrosfärer innehållande proteiner beskrivs i WO-A1-9013780, där huvudsärdraget är användning av mycket låga temperaturer under framställningen av mikrosfärerna i syfte att bevara hög biologisk aktivitet hos proteiner. Aktiviteten för inkapslat superoxiddismutas uppmättes enbart på den del som frisattes från partiklarna. Denna metod har använts för framställning av PLGA-mikrosfärer innehållande humant tillväxthormon i WO-A1-9412158, varvid man dispergerar humant tillväxthormon i metylenklorid innehållande PLGA, sprayar den erhållna dispersionen i en behållare med frusen etanol med ett skikt av flytande kväve däröver i syfte att frysa de fina dropparna samt låter dessa sedimentera i kvävet på etanolen. Etanolen upptinas därefter och mikrosfärerna börjar sjunka i etanolen, där metylenkloriden extraheras i etanolen och mikrosfärerna bringas att hårdna. Med hjälp av denna metodik kan man bibehålla proteinstabiliteten bättre

re än vid flertalet andra processer för inneslutning av proteiner i PLGA-mikrosfärer, och nyligen har också en produkt blivit godkänd av registreringsmyndigheterna i USA. Det återstår emellertid fortfarande att entydigt på-
5 visa detta också för andra proteiner och problemet med exponering av det inneslutna biologiskt aktiva ämnet för ett mycket lågt pH under nedbrytningen av PLGA-matrisen kvarstår.

Vid de tidigare nämnda metoderna baserade på inkaps-
10 ling med PLGA utsättes dock de aktiva substanserna för ett organiskt lösningsmedel, och detta är allmänt sett skadligt för stabiliteten hos ett protein. Dessutom är de omtalade emulsionsprocesserna komplicerade och sannolikt problematiska vid ett försök till uppskalning till in-
15 dustriell skala. Vidare är många av de organiska lösningsmedel som utnyttjas vid många av dessa processer förknippade med miljömässiga problem, och deras höga affinitet för PLGA-polymeren gör ett avlägsnande svårt.

Ett antal försök att lösa ovan beskrivna problem orsakade av exponering av det biologiskt aktiva ämnet för
20 en kemiskt sur miljö under bionedbrytningen av mikrosfärmatrisen och organiska lösningsmedel vid tillverkningsprocessen har beskrivit. För att undvika sur miljö under nedbrytningen har man försökt att byta ut PLGA som matris
25 för mikrosfärerna mot en polymer som ger kemiskt neutrala nedbrytningsprodukter och för att undvika att utsätta det biologiskt aktiva ämnet för organiska lösningsmedel har man försökt att antingen tillverka mikrosfärerna i förväg och först efter upparbetning och torkning försökt ladda
30 dem med det biologiskt aktiva ämnet, eller försökt avsluta eller begränsa det organiska lösningsmedlet under tillverkning av mikrosfärerna. Ett förfarande för att begränsa den använda mängden lösningsmedel vid användande av polymerer som endast kan lösas i organiska lösningsme-
35 del beskrivs i WO 99/20253, vari begränsningen erhålls genom att en vattenbaserad PEG-lösning används för att bilda en emulsion. I denna skrift berörs inte någon tek-

nik för att koncentrera eller solidifiera den biologiskt aktiva substans som skall införlivas i mikropartiklarna.

- Exempelvis har höggrenad stärkelse med relativt låg molvikt (maltodextrin, medelmolekylvikt ca 5000 Da) modifierats kovalent med akrylgrupper för överföring av denna stärkelse i en form som kan solidifieras till mikrosfärer och den erhållna polyakrylstärkelsen har överförs till partikulär form genom radikalpolymerisation i en emulsion med toluen/kloroform (4:1) som ytterfas (Characterization of Polyacryl Starch Microparticles as Carriers for Proteins and Drugs. Artursson et al, J Pharm Sci, 73, 1507-1513, 1984). Proteiner kunde infångas i dessa mikrosfärer, men tillverkningsbetingelserna utsätter det biologiskt aktiva ämnet för både organiska lösningsmedel och höga skjuvkrafter vid tillverkningen av emulsionen. De erhållna mikrosfärerna löses upp enzymatiskt och pH kan förväntas bibehållas neutralt. De erhållna mikrosfärerna är inte lämpliga för parenteral administration, speciellt upprepad sådan, av flera skäl. Allra väsentligast är den ofullständiga och mycket långsamma bionedbrytbarheten av både stärkelsematrisen (Biodegradable Microspheres IV. Factors Affecting the Distribution and Degradation of Polyacryl Starch Microparticles. Laakso et al, J Pharm Sci, 75, 962-967, 1986) och den syntetiska polymerkedja som tvärbinder stärkelsemolekylerna. Dessutom är dessa mikrosfärer alltför små, med en diameter $<2 \mu\text{m}$, för att vara lämpliga för injektion i vävnaderna för förlängd frisättning, då vävnadsmakrofager med lätthet kan fagocytera dem. Försök att höja nedbrytningshastigheten och graden av nedbrytning genom att införa en potentiellt bionedbrytbar estergrupp för att binda akrylgrupperna till den höggrenade stärkelsen ledde inte till avsett resultat och även dessa polyakrylstärkelsemikrosfärer bionedbröts alltför långsamt och ofullständigt under rimliga tidsperioder (BIODEGRADABLE MICROSPHERES: Some Properties of Polyacryl Starch Microparticles Prepared from Acrylic

acid Esterified Starch. Laakso and Sjöholm. 1987 (76) pp 935-939. J Pharm Sci.).

Mikrosfärer av polyakryldextran har tillverkats i tvåfas-vattensystem (Stenekes et al, The Preparation of
 5 Dextran Microspheres in an All-Aqueous System: Effect of the Formulation Parameters on Particle Characteristics. Pharmaceutical Reserach, Vol 15, No 4, 1998, 557-561 and Franssen och Hennink, A novel preperation method for polymeric microparticles without using organic solvents,
 10 Int J Pharm 168, 1-7, 1998). Med detta tillvägagångssätt undviker man att utsätta det biologiskt aktiva ämnet för organiska lösningsmedel men i övrigt får mikrosfärerna egenskaper motsvarande de egenskaper som har beskrivits för polyakrylstärkelsemikrosfärer ovan, vilket gör dem
 15 olämpliga för upprepade parenteral administration. Med tanke på att människan inte har specifika dextrannedbrytande enzymer bör nedbrytningshastigheten vara ännu lägre än för polyakrylstärkelsemikrosfärer. Användning av dextran är också förknippad med en viss risk för allvarliga
 20 allergiska reaktioner.

Tillverkning av stärkelsemikrosfärer med användning av icke kemiskt modifierad stärkelse med utnyttjande av en olja som ytterfas har beskrivits (US 4,713,249; Schröder, U., Crystallized carbohydrate spheres for slow rele-
 25 ase and targeting. Methods Enzymol. 1985 (112) 116-128; Schröder, U., Crystallized carbohydrate spheres as a slow release matrix for biologically actived substances. Biomaterials 5:100-104, 1984). Mikrosfärerna solidifieras i dessa fall genom utfällning i aceton, vilket leder både
 30 till att det biologiskt aktiva ämnet utsätts för ett organiskt lösningsmedel och till att stärkelsens naturliga tendens att solidifieras genom fysikalisk tvärbinding inte utnyttjas under tillverkningsprocessen. Detta leder i sin tur till mikrosfärer med en inneboende instabilitet
 35 då stärkelsen efter resuspendering i vatten och vid exponering för kroppsvätskorna kommer att sträva efter att bilda sådana tvärbindingar. För att en vatten-i-olja

emulsion skall erhållas krävs höga skjuvkrafter och de mikrosfärer som bildas är alltför små för att vara lämpliga för parenteral förlängd frisättning.

- I EP 213303 A2 beskrivs framställning av mikrosfärer av
- 5 bland annat kemiskt omodifierad stärkelse i tvåfas- vattensystem, med utnyttjande av stärkelsens naturliga förmåga att solidifieras genom bildning av fysikaliska tvärbindingar, och immobilisering av en substans i dessa mikrosfärer i syfte att undvika att exponera den biologiskt aktiva ämnet för organiska lösningsmedel. Den beskrivna metodiken, i kombination med den stärkelsekvalité som definieras, ger inte upphov till fullständigt bionedbrytbara partiklar. De erhållna partiklarna är inte heller lämpliga för injektion, framför allt för upprepade
- 10 injektioner under längre tid, då den beskrivna stärkelsekvalitén innehåller alltför höga mängder av främmande växtprotein. I motsats till vad som lärs ut av detta patent har det nu också överraskande upptäckts att betydligt bättre utbyte och högre laddning av den biologiskt aktiva molekylen kan erhållas om man använder betydligt
- 15 högre koncentrationer av polymererna än vad som krävs för att bilda tvåfas-vattensystemet och detta leder också till fördelar vad gäller betingelserna för att erhålla stabila, icke aggregerade, mikrosfärer och deras storleksfördelning. De temperaturbehandlingar som beskrivs är inte användbara för känsliga makromolekyler och detsamma gäller upparbetningen som innefattar torkning med antingen etanol eller aceton.
- 20

- Alternativa metoder för att i tvåfas-vattensystem
- 30 tillverka mikrosfärer har beskrivits. I US 5 981 719 tillverkas mikropartiklar genom blandning av den biologiskt aktiva makromolekylen med en polymer vid ett pH nära den isoelektriska punkten för makromolekylen och stabilisering av mikrosfärerna genom tillförsel av energi, företrädesvis värme. Den lägsta andelen av makromolekyl, d.v.s. det biologiskt aktiva ämnet, i beredningen
- 35 är 40% och detta är för de flesta applikationer för högt

och leder till stor osäkerhet i den injicerade mängden aktiv substans då dosen av mikropartiklarna blir alltför låg. Även om tillverkningsmetoden beskrivs som mild och kapabel att bibehålla den biologiska aktiviteten av det

5 infångade biologiskt aktiva ämnet, stabiliseras mikropartiklarna genom värmning och i de angivna exemplen sker uppvärmning till minst 58°C i 30 min och i många fall till 70-90°C under motsvarande tid, vilket känsliga proteiner, vars biologiska aktivitet är beroende av en tre-

10 dimensionell struktur, inte kan förväntas tåla, och även i de fall proteinet skenbart har tålt tillverkningsprocessen föreligger en risk för små, men ändå icke försumbara, förändringar i proteinets konformation. Som yterfas används alltid en kombination av två polymerer,

15 oftast polyvinylpyrrolidon och PEG, vilket komplicerar tillverkningsförfarandet genom att båda dessa substanser ska tvättas bort från mikrosfärerna på ett reproducerbart och säkert sätt. De bildade mikropartiklarna är för små (i exemplen anges värden under 0,1 µm i diameter) för att

20 vara lämpliga för parenteral förlängd frisättning efter t.ex. subkutan injektion, då makrofager, som är celler specialiserade på att fagocytera partiklar och som finns i vävnaderna, med lätthet förmår att fagocytera mikrosfärer upp till 5-10, möjligen 20 µm, och de fagocyterade

25 partiklarna lokaliseras intracellulärt i lysosomerna, där både partiklarna och den biologiskt aktiva substansen bryts ned, varvid den terapeutiska effekten går förlorad. Den mycket ringa partikelstorleken gör också upparbetningen av mikrosfärerna mer komplicerad, då önskvärda metoder, såsom filtrering, inte kan användas. Motsvarande

30 gäller för US-5 849-884.

I US 5 578 509 och EP 0 688 429 B1 beskrivs användning av tvåfas-vattensystem för tillverkning av makromolekylära mikropartikellösningar och kemisk eller termisk

35 tvärbinding av de dehydrerade makromolekylerna till bildning av mikropartiklar. Det är i högsta grad icke önskvärt att kemiskt tvärbinda den biologiskt aktiva mak-

romolekylen, vare sig med sig själv eller med mikropartikelmatrisen, eftersom sådana kemiska modifieringar har flera allvarliga nackdelar, såsom reduktion av bioaktiviteten av ett känsligt protein och risk för inducering av ett immunsvär mot de nya antigena determinanterna på proteinet, vilket leder till ett behov av omfattande toxikologiska studier för att undersöka produktens säkerhet. Mikropartiklar som tillverkas genom kemisk tvärbinding med glutaraldehyd är kända sedan tidigare och anses allmänt olämpliga för upprepade administrationer parenteralt på människa. De mikropartiklar som beskrivs i US 5 578 509 lider generellt av samma nackdelar som beskrivits för US 5 981 719, med olämpliga tillverkningsbetingelser för känsliga proteiner, antingen genom att dessa utsätts för kemisk modifiering eller för skadliga temperaturer, och en mikropartikelstorleksfördelning som är för snäv för parenteral, förlängd frisättning och som komplicerar upparbetning av mikrosfärerna efter tillverkning.

I WO 97/14408 beskrivs användning av luftsuspen-sionsteknik för framställning av mikropartiklar för förlängd frisättning efter parenteral administration utan att det biologiskt aktiva ämnet exponeras för organiska lösningsmedel. Skriften ger emellertid ingen vägledning mot förfarandet enligt uppfinningen eller mot de nya mikropartiklar som kan erhållas därigenom.

I US 5 470 582 framställs en mikrosfär bestående av PLGA och innehållande en makromolekyl genom ett tvåstegsförfarande, där själva mikrosfären tillverkas först med utnyttjande av organiska lösningsmedel och laddas med makromolekylen i ett senare steg, där det organiska lösningsmedlet redan har avlägsnats. Detta förfaringssätt leder till alltför lågt innehåll av det biologiskt aktiva ämnet, oftast 1-2%, och till att en mycket stor andel frisätts omedelbart efter injektion, vilket oftast är synnerligen olämpligt. Denna alltför snabba initiala frisättning är mycket hög redan vid en laddning av 1% och blir än mer uttalad vid högre innehåll av den aktiva sub-

stansen i mikrosfärerna. Vid nedbrytningen av PLGA-matrisen sjunker pH till nivåer som oftast inte är acceptabla för känsliga makromolekyler.

Att stärkelse teoretiskt är ett mycket lämpligt, 5
kanske till och med idealiskt, matrismaterial för mikro-
partiklar har varit känt under lång tid eftersom stärkel-
se inte behöver lösas i organiska lösningsmedel och har
en naturlig tendens att solidifiera och eftersom det
finns kroppsegna enzymer som kan bryta ned stärkelse till
10 kroppsegna och neutrala ämnen, i slutänden glukos, samt
att stärkelse, förmodligen på grund av likheten med
kroppseget glykogen, har visats vara icke immunogent.
Trots stora ansträngningar har emellertid stärkelse med
egenskaper som möjliggör tillverkning av mikropartiklar
15 lämpliga för parenteral användning och betingelser som
möjliggör tillverkning av fullständigt bionedbrytbara
mikropartiklar under milda betingelser som tillåter in-
fångning av känsliga biologiskt aktiva substanser, såsom
proteiner, ej beskrivits tidigare.

20 Stärkelsegranuler innehåller naturligt föroreningar,
såsom stärkelseproteiner, vilket gör dem olämpliga för
injektion parenteralt. Vid oavsiktlig deponering av icke
tillräckligt renad stärkelse, såsom kan ske vid operatio-
ner då många typer av operationshandskar är pudrade med
25 stabiliserade stärkelsegranuler, kan mycket allvarliga
biverkningar uppkomma. Stärkelsegranuler i sig är inte
heller lämpliga för upprepad parenteral administration av
det skälet att de inte är fullständigt bionedbrytbara
inom acceptabla tidsrymder.

30 Stärkelsemikrosfärer tillverkade av syrahydrolyserad
och uppenad stärkelse har använts för parenteral admi-
nistration på människa. Mikrosfärerna tillverkades genom
kemisk tvärbindning med epiklorhydrin under starkt alka-
liska betingelser. Den kemiska modifiering som då erhöles
35 av stärkelsen leder till en sänkning av bionedbrytbarhe-
ten så att mikrosfärerna kan lösas upp fullständigt av
kroppsegna enzymer, såsom α -amylas, men inte omvandlas

fullständigt till glukos som slutprodukt. Varken till-
verkningsmetoden eller de erhållna mikrosfärerna är lämp-
liga för immobilisering av känsliga proteiner och såsom
framgår av kontrollförsöken är inte heller syrahydrolyse-
5 rad stärkelse lämplig för framställning av vare sig full-
ständigt biodegraderbara stärkelsemikrosfärer eller stärke-
semikrosfärer innehållande en hög laddning av ett bio-
logiskt aktivt ämne, såsom ett protein.

Hydroxietylstärkelse (HES) administreras parenteralt
10 i höga doser till människa som en plasmaersättare. HES
framställs genom att stärkelsegranuler från stärkelse be-
stående i stort uteslutande av höggrenat amylopektin,
s.k. "waxy maize", eller vaxartad majsstärkelse, syrahyd-
rolyseras för en minskning av molviktsfördelningen, och
15 därefter hydroxietyleras under alkaliska betingelser samt
syrahydrolyseras ytterligare en gång för att en medelmol-
vikt kring 200 000 Da skall uppnås. Därefter utföres fil-
trering, extraktion med aceton och spraytorkning. Hydrox-
ietyleringens syfte är att förlänga effektens varaktig-
20 het, då icke modifierat amylopektin bryts ned mycket
snabbt av α -amylas och dess uppehållstid i cirkulation är
ca 10 minuter. HES är inte lämplig för framställning av
fullständigt biodnedbrytbara mikrosfärer innehållande ett
biologiskt aktivt ämne, eftersom den kemiska modifiering-
25 en leder till en avsevärd sänkning i hastigheten för och
fullständigheten i bionedbrytningen och till att stärke-
sens naturliga tendens att solidifieras genom bildande av
icke kovalenta tvärbindningar eliminerats. Dessutom blir
högkoncentrerade lösningar av HES alltför viskösa för att
30 vara användbara för framställning av mikropartiklar. An-
vändningen av HES i dessa höga doser visar att parente-
ralt användbar stärkelse kan tillverkas, även om HES inte
är användbar för tillverkning av mikrosfärer utan kemisk
tvärbindning eller utfällning med organiska lösningsme-
35 del.

I WO 99/00425 beskrivs användning av värmetåliga
proteolytiska enzymer med brett pH-optimum för att rena

stärkelsegranuler från ytassocierade proteiner. De erhållna granulerna är inte lämpliga för parenteral administration då de fortfarande innehåller de stärkelseproteiner som finns inuti granulerna och det finns risk för att rester av de tillsatta proteolytiska enzymerna finns kvar i granulerna. Granulerna är inte heller lämpliga för tillverkning av parenteralt administrerbara stärkelsemikrosfärer i tvåfas-vattensystem, då de har fel molviktsfördelning för att kunna användas i tillräckligt hög koncentration, även efter upplösning, och i de fall mikrosfärer kan erhållas är de troligtvis inte fullständigt biodnedbrytbara.

Användning av skjuvning för att modifiera molviktsfördelningen av stärkelse, i syfte att få fram bättre stärkelse för framställning av tabletter, beskrivs i US 5,455,342. Den stärkelse som erhålls är inte lämplig för parenteral administration på grund av det höga innehållet av stärkelseproteiner, som eventuellt kan föreligga i denaturerad form efter skjuvningen, och den erhållna stärkelsen är inte heller lämplig för framställning av biodnedbrytbara stärkelsemikrosfärer för parenteral administration eller för användning i tvåfas-vattensystem för framställning av dylika stärkelsemikrosfärer.

Det är i många fall nödvändigt eller önskvärt att modifiera ett biologiskt aktivt ämne, t.ex. läkemedel från löslig till fast form, t.ex. för att förbättra dess stabilitet och/eller möjliggöra att på ett effektivt sätt framställa en formulering av ämnet ifråga. Till exempel kan det i en inneslutningsprocess som utnyttjar ett emulsionsförfarande vara nödvändigt att använda en fast form av det biologiskt aktiva ämnet för att få en högre effektivitet genom undvikande av transport till den yttre fasen, eller gränsytan mellan yttre och inre fas, och för att bibehålla den biologiska aktiviteten av ämnet. För ämnen som tål stränga tillverkningsbetingelser kan strängsprutning och malning användas, men för känsliga biologiskt aktiva ämnen, såsom proteiner är det i de all-

ra flesta fall fråga om att erhålla den fasta formen genom kemisk komplexbildning. Ett väl känt exempel på sådan läkemedelsberedning på marknaden är kristallint insulin komplexbundet med zink.

- 5 Sålunda är det väl känt att för proteiner och peptider har komplexbindning med divalenta metalljoner, företrädesvis zink, utnyttjats sedan länge för att överföra det biologiskt aktiva ämnet i fast form. Det finns dock ett flertal nackdelar med sådana processer. En nackdel är
- 10 att det inte är möjligt att bilda användbara komplex av alla intressanta biologiskt aktiva ämnen och att många komplexbildare som används i forskningssammanhang inte är acceptabla för parenteral administration. En annan nackdel är den ofta komplicerade kemin som även i skenbart
- 15 enkla fall kan kräva betydande insatser att få kontrollerad och välkarakteriserad. En annan nackdel är att registreringsmyndigheterna i vissa länder anser att även välkända och marknadsförda substanser efter dylik komplexbildning är att anse som en ny kemisk substans, vilket
- 20 leder till krav på extensiva och mycket dyrbara karakteriseringar kemiskt, säkerhetsmässigt och kliniskt. Ytterligare nackdelar introduceras då den aktiva substansen ska överföras i fast och torr form, då detta ofta involverar spraynings- och torkningsprocesser som är utrustningskrävande och i många fall kan vara komplexa. Många känsliga ämnen tål inte att utsättas för en luft/vatten-
- 25 eller luft/organisk-vätskegränsyta eller för de skjuvkrafter som krävs för att bilda spraydropparna. Det är inte heller ovanligt att problem med att dispergera eller resuspendera den i fast form överförda substansen efter
- 30 torkningen inte leder till ett användbart resultat, t.ex. på grund av att dessa partiklar vidhäftar till varandra på ett sådant sätt att de inte kan slås isär med användande av acceptabla betingelser. I flera av dessa processer används organiska lösningsmedel som riskerar att vara
- 35 skadliga för känsliga biologiskt aktiva ämnen och perso-

nal som kommer i kontakt med ämnena, samt har en negativ inverkan på miljön.

I US 5,654,010 och US 5,664,808 beskrivs framställning av en fast form av rekombinant humant tillväxthormon, hGH, genom komplexbildning med zink för att skapa ett amorft komplex, som sedan mikroniseras genom ett ultraljudsmunstycke och sprayas ner i flytande kväve för att frysa dropparna. Det flytande kvävet får sedan evaporera vid en temperatur på -80°C och det resulterande materialet frystorkas. Förutom att processen är komplex och svår att applicera generellt så innefattar den en sprayningsprocess där det biologiskt aktiva ämnet utsätts för en vatten/lufttyta och där den amorfa form av proteinet som bildas suspenderas i metylenklorid. Metylenklorid är ett i högsta grad oönskat organiskt lösningsmedel ur toxikologisk synpunkt, både för patienterna och arbetspersonalen.

Ett förfarande för framställning av parenteral administrerbara mikropartiklar med följande egenskaper skulle sålunda vara synnerliga önskvärt:

- ett förfarande som gör det möjligt att infånga känsliga biologiskt aktiva substanser i mikropartiklar med bibehållande av sin biologiska aktivitet;
- ett förfarande medelst vilket man kan infånga biologiskt aktiva substanser under betingelser som inte utsätter dessa för organiska lösningsmedel, höga temperaturer eller höga skjuvkrafter och som medger att dessa bibehåller sin biologiska aktivitet;
- ett förfarande som möjliggör hög laddning av en parenteralt administrerbar beredning med även känsliga biologiskt aktiva substanser.
- ett förfarande medelst vilket man kan framställa en i huvudsak fullständigt bionedbrytbar och biokompatibel beredning som är lämplig att injicera parenteralt och vid vars nedbrytning kemiskt neutrala kroppsegna ämnen bildas;

- ett förfarande medelst vilket man kan framställa en parenteralt injicerbar beredning med en storlek överstigande 20 μm och ännu hellre överstigande 30 μm i syfte att undvika fagocytos av vävnadsmakrofager och förenkla upparbetning av densamma under tillverkningen;
5
- ett förfarande för framställning av mikropartiklar innehållande en biologiskt aktiv substans, vilka kan användas som mellanprodukt vid framställning av en beredning för reglerad, förlängd eller fördröjd frisättning och som möjliggör rigorös kvalitetskontroll av den infångade biologiska substansens kemiska stabilitet och biologiska aktivitet;
10
- ett förfarande som utnyttjar en parenteralt acceptabel stärkelse som är lämplig för framställning av i huvudsak fullständigt bionedbrytbara stärkelsemikropartiklar;
15
- ett förfarande som gör det möjligt att koncentrera eller solidifiera den biologiskt aktiva substans som ska införlivas i en parenteralt injicerbar beredning utan användning av kemisk komplexbildning;
20
- ett förfarande som gör det möjligt att koncentrera eller solidifiera den biologiskt aktiva substans som ska införlivas utan användning av kemisk komplexbildning och med bibehållande av substansens biologiska aktivitet;
25
- ett förfarande som gör det möjligt att koncentrera eller solidifiera den biologiskt aktiva substans som ska införlivas i en parenteralt administrerbar beredning utan att substansen utsätts för luft/vatten eller luft/organiskt-lösningsmedelgränssytor.
30
- ett förfarande som gör det möjligt att koncentrera eller solidifiera den biologiskt aktiva substans som ska införlivas i en parenteralt administrerbar beredning utan användning av ett sprayningsförfarande eller torkningsförfarande;
35

- ett förfarande som gör det möjligt att undvika ett rekonstitutionssteg och/eller resuspenderingssteg av den biologiskt aktiva substansen från torrt tillstånd utan föregående stabilisering genom införlivande i mikropartiklar;
- ett förfarande som gör det möjligt att koncentrera eller solidifiera den biologiskt aktiva substans som ska inkorporeras utan införande av ytterligare kemiska substanser vid utnyttjande av ett två-fas-vattensystem för tillverkning av mikropartiklar;
- en i huvudsak fullständigt bionedbrytbar och biokompatibel mikropartikulär beredning som är lämplig att injicera parenteralt och vid vars nedbrytning kemiskt neutrala kroppsegna ämnen bildas;
- en mikropartikulär beredning innehållande en biologiskt aktiv substans och med en partikelstorleksfördelning som är lämplig för att drageras med hjälp av luftsuspensionsteknik samt med tillräckligt mekaniskt hållfasthet för detta ändamål;
- en dragerad mikropartikulär beredning innehållande en biologiskt aktiva substans, vilken beredning ger en kontrollerad frisättning efter parenteral-administration.

25 BESKRIVNING AV UPPFINNINGEN

Enligt en första aspekt av föreliggande uppfinning tillhandahåller denna ett förfarande för framställning av mikropartiklar. Närmare bestämt är det fråga om framställning av mikropartiklar som innehåller en biologiskt aktiv substans och som primärt är avsedda för parenteral administration av denna substans till ett däggdjur, speciellt människa. I första hand är det fråga om framställning av mikropartiklar avsedda för injektion. Eftersom mikropartiklarna i första hand är avsedda för injektion, är det företrädesvis fråga om framställning av partiklar med en medeldiameter inom intervallet 10-200 μm , vanligtvis 20-100 μm och speciellt 20-80 μm .

Uttrycket "mikropartiklar" används härvid i samband med uppfinningen som generell benämning för partiklar av viss storlek i enlighet med i och för sig känd teknik. En typ av mikropartiklar är sålunda mikrosfärer, vilka har i

5 huvudsak sfärisk form, under det att begreppet mikropartikel generellt kan innefatta avvikelser från sådan ideal sfärisk form. Även det i och för sig kända begreppet mikrokapsel faller inom uttrycket mikropartikel i enlighet med känd teknik.

- 10 Förfarandet enligt föreliggande uppfinning innefattar närmare bestämt att man
- a) bereder en vattenbaserad lösning av den biologiskt aktiva substans som ska införlivas i mikropartiklarna,
 - b) blandar den i steg a) erhållna lösningen med en vattenbaserad lösning av polyetylenglykol (PEG) under sådana betingelser att den biologiskt aktiva substansen koncentreras och/eller solidifieras,
 - 15 c) eventuellt tvättar den i steg b) erhållna koncentrerade och/eller solidifierade biologiskt aktiva substansen,
 - 20 d) blandar den i steg b) eller c) erhållna koncentrerade och/eller solidifierade biologiskt aktiva substansen med en vattenbaserad stärkelselösning,
 - 25 e) blandar den i steg d) erhållna kompositionen med en vattenbaserad lösning av en polymer med förmåga att bilda ett tvåfas-vattensystem, så att det bildas en emulsion av stärkelsedroppar, vilka innehåller den biologiskt aktiva substansen som inre fas i en yttre fas av nämnda polymerlösning,
 - 30 f) bringar eller tillåter de i steg e) erhållna stärkelsedropparna att solidifieras till stärkelsemikropartiklar,
 - g) torkar stärkelsemikropartiklarna från steg f), och
 - h) eventuellt applicerar ett frisättningsreglerande hölje
 - 35 av en biokompatibel och bionedbrytbar polymer på de torkade stärkelsemikropartiklarna från steg f).

Även om det rent generellt är möjligt att införliva biologiskt aktiva substanser i mikropartiklar med hög effektivitet då den biologiskt aktiva substansen föreligger i löslig form under infångningssteget, är det i vissa fall att föredraga att den biologiskt aktiva substansen överförs i fast form. Det kan till exempel röra sig om att ytterligare stabilisera den biologiskt aktiva substansen under infångningssteget, att öka utbytet eller laddningen ytterligare genom att överföra ämnet till en form som efter blandning med innerfasen (stärkelselösningen) ej kan fördelas ut i ytterfasen eller till gränzytan mellan inner- och ytterfas eller att överföra substansen i en form som är så inert som möjligt under tillverkningen av stärkelsemikropartiklarna, detta för att man exempelvis skall få förbättrade egenskaper vad avser storleksfördelningen av mikropartiklarna.

Det har sålunda mycket överraskande befunnits att PEG, som ofta används som polymer för att skapa den yttre fasen i ett tvåfas-vattensystem, också kan användas för att koncentrera och/eller solidifiera den biologiskt aktiva substans som ska infångas, samt att detta kan utföras under milda betingelser som kan bevara t.ex. ett proteins tredimensionella konformation och biologiska aktivitet.

Detta förfarande har ett flertal fördelar jämfört med tidigare känd teknik. Grundläggande är att det inte är alla biologiskt aktiva ämnen som går att komplexbinda kemiskt, t.ex. med zink, och det är inte alla komplexbildare som är acceptabla för parenteral administration. Det är för det första inte nödvändigt att komplexbinda den biologiskt aktiva substansen, företrädesvis ett protein eller en peptid, för att erhålla koncentrerings-/solidifieringen. Användningen av detta förfarande leder för det andra ofta också till bättre stabilitet under införlivandet i mikropartiklar jämfört med lösligt protein. Genom att förfarandet inte innefattar ett spraynings- eller torkningsförfarande innan den biologiskt aktiva

substansen införlivas i mikropartiklarna undviker man dessutom att utsätta den biologiskt aktiva substansen för höga skjuvkrafter och för gränsytor (luft/vatten eller luft/organiskt lösningsmedel). Vidare undviker man aggre-
5 gering på grund av elektrostatiske laddningar, något som är mycket vanligt förekommande för små, torra partiklar. Eventuella problem med våtning och resuspendering av ett torrt pulver av den biologiskt aktiva substansen kan också undvikas. Rent generellt är vidare sprayningsförfaran-
10 den komplexa och svårkontrollerade. Inte heller är det nödvändigt att utnyttja processteg som nedfrysning och långsam upptining för att överföra det biologiskt aktiva ämnet i torr form.

För steg a) av förfarandet enligt uppfinningen gäller
15 er att den vattenbaserade lösningen av den biologiskt aktiva substansen beredes medelst inom området väl kända metoder, vilka inte behöver beskrivas närmare här. Grundläggande är dock naturligtvis att lösningen beredes under så milda betingelser, främst vad gäller temperatur och
20 omrörning, att den biologiskt aktiva substansens bioaktivitet bevaras. Ofta används dessutom inom området välkända, för parenteralt bruk acceptabla, buffertsubstanser för kontroll eller reglering av lösningens pH-värde. Vid behov kan dessutom också inom området välkända och för
25 parenteralt bruk acceptabla ämnen användas för exempelvis justering av jonstyrka och osmolaritet. Den erhållna lösningen kan, när så önskas, steriliseras medelst exempelvis sterilfiltrering.

Genom användningen av den vattenbaserade lösningen
30 av polyetylenglykol i steget b) kan en koncentrerad av den biologiskt aktiva substansen, t.ex. ett protein, erhållas. Denna koncentrerad resulterar ofta i att den biologiskt aktiva substansen faller ut, dvs bildar en fällning, och att det därigenom bildas solida eller fasta
35 partiklar. Detta kan exempelvis påvisas med hjälp av ljusmikroskopisk undersökning. Då processen ofta genomföres snabbt, är partiklarnas struktur oftast amorf. Även

andra former av partiklar, t.ex. kristaller och underkyllt glas, innefattas emellertid i uppfinningen, beroende på hur processen genomföres.

I begreppet koncentreras ligger emellertid också det
5 fall då den biologiskt aktiva substansen inte faller ut utan enbart bildar en mer eller mindre högviskös lösning. Inom begreppet solidifieras ligger sålunda även det fall då en sådan högviskös lösning bildar så stabila droppar att den i praktiken kan hanteras och införlivas i mikro-
10 partiklar på i huvudsak samma sätt som om den vore en fällning. Den koncentrerade/solidifierade biologiskt aktiva substansen kan återfinnas i mikropartikelmatrisen i form av öar eller diskreta partiklar.

En utföringsform av förfarandet enligt uppfinningen
15 representeras sålunda av det fall då steg b) utföres så att solidifieringen av den biologiskt aktiva substansen leder till utfällning av densamma.

En annan utföringsform innebär att steg b) utföres så att solidifieringen av den biologiskt aktiva substansen leder till en högviskös lösning, vilken uppvisar för-
20 måga att bilda vid rumstemperatur hanterbara droppar.

Ytterligare en utföringsform av förfarandet innebär att steg b) utföres till en reversibelt solidifierad aktiv substans.

25 Ännu en utföringsform av förfarandet innebär att den solidifierade biologiskt aktiva substansen bildar en pellet eller en högviskös eller fast bottenfas vid centrifugering eller ultracentrifugering.

Med reversibelt solidifierad menas generellt att
30 ifrågavarande biologiskt aktiva substans vid upplösning, i för varje unik biologiskt aktiv substans lämpligt medium och under lämpliga betingelser, och/eller vid frisättning från mikropartiklarna in vitro och/eller in vivo återfås i väsentligen samma form, såväl kemiskt som biologiskt, som den hade före koncentrerings-
35 en/solidifieringen med polyetylenglykol.

Att den solidifierade biologiskt aktiva substansen bildar en pellet eller en högviskös eller fast bottensats vid centrifugering eller ultracentrifugering är ett sätt för påvisande av den önskade koncentrerings-

- 5 en/solidifieringen. Detta innebär dessutom att substansen ifråga föreligger i annan fysikalisk form än den lösliga form som föreligger i steg a) efter beredningen av den vattenbaserade lösningen.

- Att den biologiskt aktiva substansen föreligger i
10 koncentrerad form innebär generellt att den föreligger i en koncentration som överstiger den koncentration, vilken kan erhållas vid upplösning av substansen ifråga i ett vattenhaltigt medium, med eller utan stabilisatorer och löslighetsbefrämjande ämnen, och under bibehållande av
15 biologisk aktivitet och kemisk stabilitet.

- Huruvida steg c) av förfarandet enligt uppfinningen behöver utföras eller ej, dvs om den erhållna koncentrerade och/eller solidifierade aktiva substansen skall tvättas, och i så fall i vilken omfattning, får avgöras i
20 varje enskilt fall och beror bl.a. på hur stor andel av den biologiskt aktiva substansen som föreligger i löst form i PEG-lösningen, om den lösta substansen är tillräckligt stabil i denna form för att kunna införlivas i mikropartiklarna utan att alltför stor mängd oönskade
25 nedbrytningsprodukter bildas, vilken effekt denna lösta substans har på tillverkningen av mikropartiklarna, om man önskar använda andra betingelser, t.ex. vad gäller koncentration av och medelmolekylvikt för PEG, samt pH och jonstyrka, än vad som användes i steg b), om PEG ut-
30 gör en stabilisator för den biologiskt aktiva substansen i sig eller genom att bibehålla substansen i olöst form eller förhindra adsorption till ytor.

- Själva tvättningen av den koncentrerade och/eller solidifierade aktiva substansen kan ske medelst inom detta teknikområde etablerade lämpliga tekniker. I den allra
35 enklaste formen kan centrifugeringstvättar användas, och i många fall är även filtrering användbar. I det senare

fallet används företrädesvis betingelser under vilka den koncentrerade och/eller solidifierade aktiva substansen inte tillåts torka, då detta kan leda till exempelvis klumpbildning, och tiden för processen förkortas genom applicering av tryck. Fundamentalt är givetvis att den vätska som används inte får lösa upp den koncentrerade och/eller solidifierade aktiva substansen, och vilka betingelser som är lämpliga får avgöras för varje enskild biologiskt aktiv substans. I många fall kan sådana betingelser väljas vad avser buffertsammansättning, tillsatsämnen och temperaturer att detta krav uppfylls, och nödvändig information kan fås från litteraturen eller via enkla experiment. Naturligtvis kan tillsats av polymerer användas för undvikande av upplösning av den koncentrerade och/eller solidifierade aktiva substansen, och i det allra enklaste fallet används samma sammansättning på PEG-lösningen som då koncentrerings/solidifieringen genomfördes.

En stärkelse som är speciellt lämplig i samband med förfarandet enligt uppfinningen, liksom ett förfarande för framställning av denna, finns noggrant beskriven i den svenska patentansökningen med inlämningsdag 2000-10-06 och med titeln "Farmaceutisk acceptabel stärkelse". Detaljer avseende stärkelsen och dess framställning kan med andra ord hämtas från nämnda svenska patentansökan, vars innehåll i detta avseende sålunda härmed upptas i föreliggande text via referens.

De viktigaste särdragen för sådan stärkelse kommer emellertid att beskrivas nedan. För att fullständigt bionedbrytbara mikropartiklar med högt utbyte av den aktiva substansen skall bildas i ett tvåfas-vattensystem och för att de erhållna stärkelsemikropartiklarna skall uppvisa de egenskaper som kommer att beskrivas nedan måste stärkelsen generellt till övervägande del bestå av höggrenad stärkelse, som i det naturliga tillståndet i stärkelsegranulen benämns amylopektin. Den skall dessutom

ha en molekylviktsfördelning som gör det möjligt att uppnå önskade koncentrationer och gelningshastigheter.

I detta sammanhang kan det tilläggas att begreppet bionedbrytbar innebär att mikropartiklarna efter parenteral administration löses upp i kroppen till kroppsegna substanser, i slutänden t.ex. glukos. Bionedbrytbarheten kan bestämmas eller undersökas genom inkubation med lämpligt enzym, t.ex. alfa-amylas, in vitro. Det är härvid lämpligt att tillsätta enzymet ett flertal gånger under inkubationsperioden, så att man därigenom försäkras om att det finns aktivt enzym närvarande i inkubationsblandningen hela tiden. Bionedbrytbarheten kan även undersökas genom parenteral injicering av mikropartiklarna, t.ex. subkutant eller intramuskulärt, och histologisk undersökning av vävnaden som en funktion av tiden.

Bionedbrytbara stärkelsemikropartiklar försvinner normalt från vävnaden inom några veckor och oftast inom en vecka. I de fall då stärkelsemikropartiklarna är överdragna med ett frisättningsreglerande hölje, t.ex. dragerade, är det oftast detta hölje som avgör hastigheten för bionedbrytbarheten, vilken i sin tur avgör när alfa-amylas blir tillgängligt för stärkelsematrisen.

Biokompatibiliteten kan också undersökas genom parenteral administration av mikropartiklarna, t.ex. subkutant eller intramuskulärt, och histologisk utvärdering av vävnaden, varvid det är viktigt att beakta att den biologiskt aktiva substansen, som ofta är ett protein, i sig uppvisar förmåga att inducera t.ex. ett immunförsvar i det fall den administreras i en annan art. Exempelvis kan sålunda många rekombinant framställda mänskliga proteiner ge upphov till immunsvär i försöksdjur.

Stärkelsen måste vidare ha en renhet som är acceptabel för tillverkning av en parenteralt administrerbar beredning. Den måste även kunna bilda tillräckligt stabila lösningar vid tillräckligt hög koncentration för att möjliggöra inblandning av den biologiskt aktiva substansen under betingelser som medger att substansens bioaktivitet

bibehålls, samtidigt som den spontant måste kunna solidifieras på ett kontrollerat sätt för att stabila, men samtidigt bionedbrytbara, mikropartiklar skall erhållas. Hög koncentration av stärkelsen är också viktig för att för-
5 hindra att den biologiskt aktiva substansen fördelas ut i oacceptabel utsträckning till den yttre fasen eller till gränssytan mellan den inre och den yttre fasen.

Ett antal föredragna utföringsformer med avseende på stärkelsens karaktär är följande.

10 Stärkelsen har lämpligen ett innehåll av amylopektin överstigande 85 vikt-%, där molekyylvikten för nämnda amylopektin är reducerad, företrädesvis genom skjuvning, så att minst 80 vikt-% av materialet ligger inom intervallet 10-10000 kDa.

15 Vidare har stärkelsen lämpligen ett aminosyrakväveinnehåll understigande 50 µg per g torrsvikt stärkelse.

Stärkelsen har företrädesvis en renhet av högst 20 µg, ännu hellre högst 10 µg och allra helst högst 5 µg, aminosyrakväve per g torrsvikt stärkelse.

20 Molekylvikten för ovannämnda amylopektin är företrädesvis reducerad, företrädesvis genom skjuvning eller genom enzymatisk hydrolys, till exempel med isoamylas, så att minst 80 vikt-% av materialet ligger inom intervallet 100-4000 kDa, ännu hellre 200-1000 kDa och allra helst
25 300-600 kDa.

Stärkelsen har vidare företrädesvis ett innehåll av amylopektin med ifrågavarande reducerade molekyylvikt överstigande 95 vikt-%, ännu hellre överstigande 98 vikt-%. Den kan dessutom naturligtvis till 100 vikt-% bestå av
30 sådan amylopektin.

Enligt en annan föredragen utföringsform är stärkelsen av sådan art att den kan lösas i vatten i en koncentration överstigande 25 vikt-%. Detta innebär generellt förmåga att lösa sig i vatten i enlighet med i och för
35 sig känd teknik, dvs vanligtvis upplösning vid förhöjd temperatur, exempelvis upp till approximativt 80°C.

Enligt ytterligare en föredragen utföringsform gäller att stärkelsen i huvudsak saknar kovalent bundna extra kemiska grupper av det slag som förekommer i hydroxyetylstärkelse. Med detta menas generellt att stärkelsen
5 väsentligen enbart innehåller sådana grupper som finns i naturlig stärkelse och inte har modifierats på annat sätt, såsom i exempelvis hydroxyetylstärkelse.

En annan föredragen utföringsform innebär att stärkelsen har ett endotoxininnehåll understigande 25 EU/g.
10 Ytterligare en föredragen utföringsform innebär att stärkelsen innehåller mindre än 100 mikroorganismer per gram, ofta t o m mindre än 10 mikroorganismer per gram.

Stärkelsen kan vidare definieras som att den är i huvudsak renad från ytlokaliserade proteiner, lipider och
15 endotoxiner medelst tvättning med vattenbaserad alkali-lösning, molekylviktsreducerad medelst skjuvning samt renad från invändiga proteiner medelst jonbyteskromatografi, företrädesvis anjonbyteskromatografi.

Vad beträffar renheten i alla dessa sammanhang gäller
20 er generellt att uttryck av typen "väsentligen" eller "i huvudsak" oftast innebär till minst 90 %, t.ex. 95 %, 99 % eller 99,9 %.

Att amylopektin utgör huvudbeståndsdelen i den använda stärkelsen innebär generellt att dess andel är 60-
25 100 vikt-%, räknat på torr vikt stärkelse.

I vissa fall kan det härvid vara gynnsamt att använda en mindre andel, t.ex. 2-15 vikt-%, kortkedjig amylos för modifiering av gelningshastigheten i steg f). Medelmolekylvikten för nämnda amylos ligger företrädesvis inom
30 intervallet 2,5-70 kDa, speciellt 5-45 kDa. Övriga detaljer beträffande kortkedjig amylos kan hämtas från US-patentskrift 3,881,991.

Vid bildandet av den stärkelselösning som används i steg d) används generellt uppvärmning enligt i och för
35 sig känd teknik för upplösning av stärkelsen. En speciellt föredragen utföringsform innebär härvid samtidigt att man löser upp stärkelsen under autoklivering, varvid

den också företrädesvis steriliseras. Denna autoklavering genomförs i vattenhaltiga lösningar, t.ex. vatten för injektion eller lämplig buffert.

Om den biologiskt aktiva substansen är ett känsligt protein eller annan temperaturkänslig substans, får stärkelselösningen svalna till lämplig temperatur innan den förenas med substansen ifråga. Vilken temperatur som är lämplig avgörs i första hand av värmestabiliteten för den biologiskt aktiva substansen, men rent generellt gäller att en temperatur understigande ca 60°C, ännu hellre understigande 55°C, är lämplig.

Enligt en föredragen utföringsform förenar man därför den aktiva substansen, eller de aktiva substanserna, med stärkelselösningen vid en temperatur av högst 60°C, ännu hellre högst 55°C, och företrädesvis inom intervallet 20-45°C, speciellt 30-37°C.

För blandningsoperationen i steg d) gäller vidare att man lämpligen använder sig av ett viktförhållande stärkelse:biologiskt aktiv substans inom området från 3:1 till 10000:1

För blandningsoperationen gäller dessutom, såsom har omtalats ovan, att den aktiva substansen koncentreras/solidifieras med utnyttjande av en PEG-lösning innan den blandas med stärkelselösningen. Det är möjligt att sätta stärkelselösningen till den biologiskt aktiva substansen eller vice versa. Därefter skapas en homogen fördelning av den koncentrerade/solidifierade aktiva substansen i stärkelselösningen medelst lämplig teknik. Sådan teknik är välkänd inom området, varvid som exempel kan nämnas magnetomrörning, propelleromrörning eller användning av en eller flera statiska mixrar.

Vid framställningen av stärkelsemikropartiklarna enligt föreliggande uppfinning bör koncentrationen av stärkelse i den lösning som skall överföras till fast form, och i vilken den biologiskt aktiva substansen skall införlivas, vara minst 20 vikt-% för att stärkelsemikropartiklar med goda egenskaper skall bildas. Exakt vilken

stärkelsekoncentration som fungerar bäst i varje enskilt fall kan på ett enkelt sätt titreras ut för varje enskild biologiskt aktiv substans vid den laddning i mikropartiklarna som önskas i det enskilda fallet. Det bör i detta sammanhang observeras, att den biologiskt aktiva substans som skall införlivas i mikropartiklarna kan påverka tvåfas-systemet och stärkelsens gelningsegenskaper, vilket likaså innebär att sedvanliga för-försök utförs i syfte att bestämma de optimala betingelserna i det enskilda fallet. Oftast visar försök att stärkelsekoncentrationen med fördel bör vara minst 30 vikt-% och i vissa speciella fall minst 40 vikt-%. Som högsta gräns gäller vanligtvis 50 vikt-%, speciellt högst 45 vikt-%. Det är normalt inte möjligt att erhålla dessa höga stärkelsekoncentrationer utan användning av molekyolviktsreducerad, höggrenad stärkelse.

Beträffande den polymer som använts i steg e) i syfte att bilda ett tvåfas-vattensystem gäller att det inom just detta teknikområde finns publicerad information om ett stort antal polymerer med förmåga att bilda tvåfas-system med stärkelse som inre fas. Alla sådana polymerer får anses ligga inom ramen för föreliggande uppfinning. En speciellt lämplig polymer i detta sammanhang är dock polyetylenglykol. Företrädesvis uppvisar denna polyetylenglykol en medelmolekylvikt av 5-35 kDa, ännu hellre 15-25 kDa och speciellt ca 20 kDa.

Polymeren löses upp i lämplig koncentration i vatten- eller vattenbaserad lösning, vilket uttryck även innefattar buffertlösning, och tempereras till lämplig temperatur. Denna temperatur ligger företrädesvis inom intervallet 4-50°C, ännu hellre 10-40°C och oftast 10-37°C. Koncentrationen av polymeren i den vattenbaserade lösningen är lämpligen minst 20 vikt-% och företrädesvis minst 30 vikt-%, och lämpligen högst 45 vikt-%. Ett speciellt föredraget intervall är 30-40 vikt-%.

Blandningsoperationen i steg e) kan utföras på många olika sätt, t.ex. genom användning av propelleromrörning

eller minst en statisk mixer. Blandningen utföres normalt inom temperaturområdet 4-50°C, företrädesvis 20-40°C, ofta ca 37°C. Vid ett satsvis förfarande kan stärkelselösningen sättas till polymerlösningen eller vice versa. I det fall statiska mixrar eller blandare utnyttjas, utföres operationen lämpligen därigenom att de båda lösningarna pumpas i två separata rörledningar in i en gemensam rörledning som innehåller blandarna.

Emulsionen kan bildas under användning av låga skjuvkrafter, då det inte föreligger någon hög ytspänning mellan faserna i vatten/vatten-emulsioner, till skillnad från olja/vatten- eller vatten/olja-emulsioner, och då det primärt är stärkelselösningens viskositet som skall övervinnas för att dropparna skall uppnå viss storleksfördelning. I de flesta fall är det tillräckligt med magnet- eller propelleromrörning. I större skala, t.ex. då den mängd mikropartiklar som skall framställas överstiger 50 g, är det lämpligt att använda s.k. bafflar för erhållande av en ännu effektivare omrörning i den använda behållaren. Ett alternativt sätt för att bilda vatten/vatten-emulsionen är användning av minst en statisk mixer, varvid stärkelselösningen lämpligen pumpas med reglerad hastighet i ett rör, vari de statiska mixrarna har placerats. Pumpningen kan ske med vilken lämplig pump som helst, förutsatt att den ger jämn flödeshastighet under dessa betingelser, inte utsätter blandningen för onödigt höga skjuvkrafter och är acceptabel för tillverkning av parenterala beredningar vad avser renhet och frånvaro av läckage av oönskade substanser. Även i de fall då statiska mixrar används för skapande av emulsionen är det oftast fördelaktigt att låta solidifieringen till mikropartiklar ske i ett kärl med lämplig omrörning.

En föredragen utföringsform av förfarandet enligt uppfinningen innebär att man i steg e) sätter polymerlösningen till kompositionen i minst två steg, där en tillsats sker efter det att emulsionen har skapats eller börjat skapas.

Det ligger naturligtvis också inom ramen för föreliggande uppfinning att tillsätta polymerlösningarna i flera steg och att därvid exempelvis ändra medelmolekylvikten och/eller koncentrationen av den använda polymeren, t.ex. för att öka koncentrationen av stärkelse i den inre fasen, i de fall detta är önskvärt.

Blandningsoperationen i steg e) utföres dessutom lämpligen under sådana betingelser att de bildade stärkelsedropparna får den för mikropartiklarna önskade storleken, dvs företrädesvis en medeldiameter, i torrt tillstånd, inom intervallet 10-200 μ m, ännu hellre 20-100 μ m och helst 20-80 μ m.

Viktigt i samband med solidifieringen av mikropartiklarna är att denna sker under betingelser som är milda för den ingående biologiskt aktiva substansen, eller substanserna. Primärt är det med andra ord fråga om att använda sig av en temperatur som inte är skadlig för den närvarande substansen. Det har härvid överraskande visat sig, att kriterierna för detta och för att det skall bildas stabila mikropartiklar med lämplig storleksfördelning lättare kan uppfyllas om man under solidifieringen använder sig av mera än en temperatur eller temperaturnivå. Speciellt fördelaktigt är det om man inleder solidifieringsprocessen i tvåfas-systemet vid lägre temperatur än den temperatur som används i slutfasen av solidifieringen. En föredragen utföringsform innebär att man inleder solidifieringen inom intervallet 1-20°C, företrädesvis 1-10°C, speciellt runt 4°C, och avslutar densamma inom intervallet 20-55°C, företrädesvis 25-40°C, i synnerhet runt 37°C.

En bekräftelse på att de valda betingelserna är korrekta eller lämpliga kan man få genom att konstatera att stärkelsemikropartiklarna har önskad storleksfördelning, är stabila under de efterföljande tvättnings- och torkningsoperationerna och löses upp i huvudsak fullständigt enzymatiskt in vitro och/eller att den införlivade substansen har kapslats in på ett effektivt sätt och har bi-

behållen bioaktivitet. Det sistnämnda undersöks vanligtvis med hjälp av kromatografiska metoder eller med hjälp av andra inom tekniken etablerade metoder, in vitro eller in vivo, efter upplösning av mikropartiklarna enzymatiskt

5 under milda betingelser, och är en viktig del i att försäkra sig om ett robust och säkert tillverkningsförfarande för känsliga biologiskt aktiva substanser. Det är en stor fördel att mikropartiklarna kan lösas upp fullständigt under utnyttjande av milda betingelser, då man därigenom minimerar riskerna för preparationsinducerade artefakter, som är vanligt förekommande då exempelvis organiska lösningsmedel behövs för upplösning av mikropartiklarna, vilket exempelvis är fallet då dessa består av en PLGA-matris.

15 De bildade mikropartiklarna tvättas företrädesvis på lämpligt sätt, för avlägsnande av yttre fas och av överskott av aktiv substans. Sådan tvättning sker lämpligen genom filtrering, vilken möjliggörs av mikropartiklarnas goda mekaniska stabilitet och lämpliga storleksfördelning. Ofta kan det också vara lämpligt med tvättning medelst centrifugering, avlägsnande av supernatanten och resuspendering i tvättningsmediet. Vid varje tvättningsförfarande används ett eller flera lämpliga tvättningsmedier, vilka oftast är bufferhaltiga vattenlösningar. I samband härmed kan också siktning vid behov användas för justering av mikropartiklarnas storleksfördelning, exempelvis för eliminering av innehållet av alltför små mikropartiklar och för säkerställande av att inga mikropartiklar över en viss storlek finns närvarande i den färdiga produkten.

25 30

Torkningen av mikropartiklarna kan ske på något lämpligt sätt, t.ex. genom spraytorkning, frystorkning eller vacuumtorkning. Vilken torkningsmetod som väljs i det enskilda fallet beror ofta på vad som är lämpligast för bibehållande av den biologiska aktiviteten för den inneslutna biologiskt aktiva substansen. Även processö-
verväganden kommer in i bilden, såsom kapacitet och ren-

35

hetsaspekter. Frystorkning är ofta den föredragna torkningsmetoden, då den rätt utformad är synnerligen mild med avseende på den inneslutna biologiskt aktiva substansen. Att den införlivade biologiskt aktiva substansen har bibehållit sin bioaktivitet kan fastställas medelst för substansen lämplig analys efter enzymatisk upplösning av substansen under milda betingelser. Lämpliga enzymer för användning i samband med stärkelse är alfa-amylas och amyloglukosidas, var för sig eller i kombination, varvid de i förekommande fall bör ha konstaterats vara fria från eventuella proteaser, som kan bryta ned proteiner. Närvaro av proteaser kan detekteras med inom området kända metoder och t ex genom att man i kontrollförsök blandar den biologiskt aktiva substansen och bestämmer dess integritet på sedvanligt sätt efter inkubation med den avsedda enzymblandningen under de betingelser som sedan ska användas för upplösning av mikropartiklarna. I de fall preparationen konstateras innehålla kontamination av proteaser, kan den bytas mot en preparation med högre renhet eller renas från proteaser. Detta kan göras med inom området kända tekniker, t ex genom kromatografi med α_2 -makroglobulin bundet till lämpligt kromatografimaterial.

För modifiering av frisättningsegenskaperna för mikropartiklarna kan man dessutom eventuellt också applicera ett frisättningsreglerande hölje av en biokompatibel och bionedbrytbar polymer. Exempel på lämpliga polymerer i detta sammanhang finns i den kända tekniken, och speciellt kan polymerer av mjölksyra och glykolsyra (PLGA) nämnas. Appliceringen av ifrågavarande hölje sker förtädesvis med hjälp av luftsuspensionsteknik. En speciellt lämplig sådan teknik finns beskriven i W097/14408, och detaljer i detta avseende kan sålunda hämtas från denna skrift, vars innehåll härmed upptas i texten via referens. De stärkelsemikropartiklar som erhålles medelst förfarandet enligt föreliggande uppfinning är ytterst väl lämpade för dragering eller beläggning med hjälp av nämnda luftsuspensionsteknik, och de erhållna belagda mikro-

partiklarna är synnerligen väl lämpade för parenteral administration.

Vid användning av de framställda mikropartiklarna, vare sig de är belagda med ett frisättningsreglerande yttre hölje eller ej, och speciellt för möjliggörande av injektion, suspenderas de torra mikropartiklarna i ett lämpligt medium. Sådana medier samt förfaranden i dessa avseenden är väl kända inom området och torde inte behöva beskrivas närmare här. Själva injektionen kan göras genom en lämplig kanyl eller med en kanylfri injektor. Det är också möjligt att injicera mikropartiklarna med hjälp av en torrpulverinjektor, utan att de dessförinnan resuspenderas i ett injektionsmedium.

Förutom de fördelar som har omtalats ovan gäller att förfarandet enligt uppfinningen uppvisar den fördelen att utbytet av den biologiskt aktiva substansen generellt är högt, att det är möjligt att erhålla ett mycket högt innehåll av den aktiva substansen i mikropartiklarna under bibehållande av substansens bioaktivitet, att de erhållna mikropartiklarna har rätt storleksfördelning för användning för parenteral, reglerad (t.ex. fördröjd eller förlängd) frisättning, då de är för stora för att fagocyteras av makrofager och tillräckligt små för att kunna injiceras genom små kanyler, t.ex. 23G-25G, och att det vid nedbrytningen av mikropartiklarna bildas kroppsegna och neutrala nedbrytningsprodukter, varigenom man exempelvis kan undvika att den aktiva substansen utsättes för ett alltför lågt pH-värde. Dessutom är själva förfarandet synnerligen väl lämpat för rigorös kvalitetskontroll.

Förfarandet enligt uppfinningen är speciellt intressant i samband med proteiner, peptider, polypeptider, polynukleotider och polysackarider eller generellt andra läkemedel eller biologiskt aktiva substanser som är känsliga för eller instabila i exempelvis organiska lösningsmedel. Rekombinant framställda proteiner är en mycket intressant grupp av biologiskt aktiva substanser. Allmänt sett gäller dock att uppfinningen inte är begränsad till

närvaro av sådana substanser, eftersom uppfinningsidén är tillämpbar på vilken som helst biologiskt aktiv substans, som kan användas för parenteral administration. Förutom i samband med känslighets- eller instabilitetsproblem kan
5 uppfinningen sålunda också vara av speciellt intresse i sådana fall där det annars skulle vara svårt att avlägsna lösningsmedel eller där toxikologiska eller andra miljö-
mässiga problem skulle kunna uppträda.

Exempel på biologiskt aktiva substanser av ovan an-
10 givet slag är tillväxthormon, erytropoietin, interferon (α, β, γ -typ), vaccin, epidermalt tillväxthormon, Faktor IV, V, VI, VII, VIII och IX, LHRH-analog, insulin, makro-
fagkolonistimulerande faktor, granulocytolonistimuleran-
de faktor och interleukin.

15 Användbara biologiskt aktiva substanser av typ icke-proteinläkemedel kan väljas ur följande grupper:

Antitumörmedel, antibiotika, antiinflammatoriska me-
del, antihistaminer, sedativa medel, muskelavslappnande
medel, antiepileptiska medel, antidepressionsmedel, anti-
20 allergiska medel, bronkodilatatorer, kardiotoniska medel,
antiarrytmimedel, vasodilatatorer, antidiabetiska medel,
antikoagulerande medel, hemostatiska medel, narkotiska
medel och steroider.

Enligt en annan aspekt av uppfinningen hänför sig
25 denna också till nya mikropartiklar av det slag som kan framställas medelst förfarandet enligt uppfinningen. De
nya mikropartiklarna enligt uppfinningen är emellertid
inte begränsade till sådana som kan framställas medelst
nämnda förfarande utan omfattar alla mikropartiklar av
30 ifrågavarande slag oberoende av framställningsmetodiken.

Närmare bestämt är det fråga om mikropartiklar läm-
pade för parenteral administration, företrädesvis via in-
jektion, på ett däggdjur, speciellt människa, och inne-
hållande en biologiskt aktiv substans, vilka mikropartik-
35 lar väsentligen har samma egenskaper som de mikropartik-
lar vilka kan erhållas medelst det ovan beskrivna förfarandet.

Enligt en aspekt av uppfinningen representeras dessa av mikropartiklar, vilka väsentligen består av parente-
ralt administrerbar bionedbrytbar stärkelse som matris,
vilken innehåller den biologiskt aktiva substansen i vä-
5 sentligen icke-kemiskt komplexbunden form och i form av
fasta partiklar med en medelstorlek inom området 0,05-
30µm.

Med medelstorlek menas härvid vanligtvis medeldiame-
ter, åtminstone i fallet med sfäriska eller i huvudsak
10 sfäriska partiklar. Vid annan konfiguration avses gene-
rellt medelvärde för största utbredning av partikeln i
någon riktning.

Enligt en utföringsform av uppfinningen gäller här-
vid att partiklarna av den biologiskt aktiva substansen
15 är erhållna genom utfällning, dvs föreligger i utfälld
form.

De fasta partiklarna har företrädesvis en medelstor-
lek inom området 0,2-10µm, ännu hellre 0,5-5µm och allra
helst 1-4µm.

20 En annan utföringsform representeras av mikropartik-
lar, vari stärkelsen har ett aminosyrakväveinnehåll un-
derstigande 50 µg per g torrsvikt stärkelse och vilka sak-
nar kovalent kemisk tvärbinding mellan stärkelsemoleky-
lerna.

25 En annan utföringsform avser mikropartiklar, vari
stärkelsen har ett innehåll överstigande 85 viktprocent
av amylopektin, för vilket minst 80 viktprocent har en
medelmolekylvikt inom intervallet 10-1000 kDa.

Stärkelsen kan i övrigt uppvisa de särdrag som har
30 omtalats i samband med förfarandet.

Företrädesvis uppvisar också mikropartiklarna ett
frisättningsreglerande hölje av det slag som har omtalats
i samband med förfarandet. Även beträffande föredragna
varianter av detta hänvisas till förfarandet.

35 Andra mikropartiklar enligt uppfinningen är sådana,
vari den biologiskt aktiva substansens bioaktivitet är
minst 80%, företrädesvis minst 90% och helst väsentligen

bibehållen, jämfört med den bioaktivitet som substansen uppvisade innan den införlivades i stärkelsen.

Andra mikropartiklar enligt uppfinningen är sådana, som är bionedbrytbara in vitro i närvaro av alfa-amylas och/eller amyloglukosidas.

Ytterligare andra är sådana som är bionedbrytbara och elimineras från vävnad efter subkutan eller intramuskulär administration. Den biologiskt aktiva substansen är företrädesvis ett protein och ännu hellre ett rekombinant framställt protein.

Proteinet är företrädesvis valt bland proteinhormoner, företrädesvis tillväxthormoner, koagulationsfaktorer, företrädesvis FVII, VII, VIII och IX, LHRH-analoger, insulin och insulinanaloger, C-peptid, glukagonliknande peptider, LHRH-analoger, leptiner, kolonistimulerande faktorer, företrädesvis makrofagkolonistimulerande faktor, granulocytstimulerande faktor och granulocyt/makrofagstimulerande faktor, interferoner, företrädesvis interferon α , interferon β och interferon γ interleukiner och rekombinant framställda vacciner

Allra helst är proteinet ett tillväxthormon, speciellt ett humant tillväxthormon (hGH).

Att den biologiskt aktiva substansen i stärkelsematrisen föreligger i väsentligen icke-kemiskt komplexbunden form innebär generellt att molförhållandet totala metallkationer:biologiskt aktiv substans är mindre än 0,2:1.

Enligt den kända tekniken är det i första hand zink som har utnyttjats för komplexbindning i liknande sammanhang uppvisar sålunda den fördelen att de väsentligen eller helt saknar sådan zink.

Ännu hellre är ovannämnda molförhållande metallkationer: biologiskt aktiv substans mindre än 0,1:1, speciellt mindre än 0,01:1 och allra helst naturligtvis så nära 0 som möjligt.

I det fall det är fråga om ett humant tillväxthormon som biologiskt aktiv substans gäller att detta företrä-

desvis är ett sådant, vars innehåll av dimerer är mindre än 2 vikt-%, och ännu hellre mindre än 1 vikt-% och av polymerer mindre än 0,2 vikt-%, företrädesvis mindre än 0,1 vikt-%.

- 5 Ytterligare en föredragen utföringsform av mikropartiklarna enligt uppfinningen är sådana vari den biologiskt aktiva substansen är humant tillväxthormon och för vilka frisättningskinetiken för nämnda hGH bestämd in vitro karaktäriseras av i huvudsak kontinuerlig och jämn
10 frisättning under minst en vecka.

- Mikropartiklar vilka bildar en parenteralt administrerbar, bionedbrytbar mikropartikelberedning innehållande en biologiskt aktiv substans, vilken under de första 24 timmarna efter injektion uppvisar en frisättning
15 av den aktiva substansen som är mindre än 30% av den totala frisättningen, bestämt ur en koncentration-tidkurva i form av förhållandet mellan area under kurvan under nämnda första 24 timmar och total area under ifrågasvarande kurva.

- 20 Företrädesvis gäller att frisättningen under de första 24 timmarna efter injektionen är mindre än 20%, företrädesvis mindre än 15%, ännu hellre mindre än 10% och allra helst mindre än 5%, av den totala frisättningen.

- Mikropartiklar vilka ger en mikropartikelberedning
25 av ovan nämnda typ, vilken under de första 48 timmarna efter injektion uppvisar en frisättning av den aktiva substansen där den maximala koncentrationen i plasma eller serum är mindre än 300% av den maximala koncentrationen av den biologiskt aktiva substansen under någon tidpunkt
30 överstigande 48 timmar efter injektion.

Nämnda maximala koncentration är företrädesvis mindre än 200% och ännu hellre mindre än 100% av ifrågasvarande maximala koncentration.

- Ett annat exempel är en mikropartikelberedning av
35 ovan nämnt slag, vilken uppvisar en frisättning av den biologiskt aktiva substansen där biotillgängligheten av

nämnda substans är minst 35% av den biotillgänglighet som erhålles när ifrågavarande substans injiceras intravenöst i löslig form.

Nämnda biotillgänglighet är företrädesvis minst 45%,
5 ännu hellre minst 50%, av den biotillgänglighet som erhålles när den biologiskt aktiva substansen injiceras intravenöst.

Ytterligare ett exempel är en mikropartikelberedning av nämnt slag, vilken uppvisar en frisättning av den aktiva substansen karakteriserad av att i den frisättning
10 som sker under vilken som helst sammanhängande sjudagarsperiod är kvoten mellan den högsta koncentrationen av den biologiskt aktiva substansen i serum eller plasma dividerat med medelkoncentrationen under nämnda sjudagarsperiod
15 mindre än 5, förutsatt att den valda sjudagarsperioden inte inkluderar de första 24 timmarna efter injektion.

Nämnda frisättning är företrädesvis mindre än 4 gånger, ännu hellre mindre än 3 gånger och allra helst mindre än 2 gånger.

20 En annan mikropartikelberedning som kan erhållas medelst mikropartiklarna enligt uppfinningen uppvisar en frisättning av den biologiskt aktiva substansen där medeluppehållstiden för ifrågavarande substans är minst 4 dagar.

25 Företrädesvis är nämnda medeluppehållstid minst 7 dagar, ännu hellre minst 9 dagar, t.ex. minst 11 dagar eller speciellt minst 13 dagar.

De särdrag som har angivits för de ovan presenterade mikropartikelberedningarna kan kombineras i vilka som
30 helst lämpliga kombinationer.

För de olika karakteristika som har angivits för mikropartikelberedningen ovan gäller mera specifikt att det primärt rör sig om begreppen MRT, burst och biotillgänglighet.

35 Dessa kan definieras enligt följande.

MRT

Ett mål med beredningar för kontrollerad frisättning är att få en förlängd frisättning av det aktiva materialet. Ett mått man kan använda för att kvantifiera frisättnings-
 5 sättningstiden är medeluppehållstid eller "mean residence time" (MRT) som är det vedertagna begreppet inom farmakokinetik.

MRT är genomsnittstiden som molekylerna som introducerats i kroppen uppehåller sig i kroppen. (Clinical
 10 Pharmacokinetics. Concepts and Applications. Malcolm Rowland and Thomas N. Tozer. 2nd ed. Lea&Febiger, Philadelphia London)

MRT-värdet kan beräknas från plasmakoncentrationsdata genom följande formel.

$$15 \quad MRT = \frac{\int_0^{\infty} t C dt}{\int_0^{\infty} C dt}$$

där C är plasmakoncentrationen och t är tiden

Burst

Ett vanligt problem med beredningar för kontrollerad
 20 frisättning för parenteralt bruk är att det omedelbart efter administrering i kroppen frisätts en stor del av läkemedlet under tidig fas. Detta kallas inom facklitteraturen för "burst-effect" Detta beror oftast på att läkemedlet befinner sig på ytan av formuleringen eller att
 25 formuleringen (som kan bestå av mikropartiklar) spricker upp. En låg bursteffekt är mycket önskvärd eftersom en hög koncentration av läkemedlet kan vara toxisk och dessutom utnyttjas den del som försvinner snabbt första tiden dåligt, vilket innebär att mer läkemedel krävs för
 30 att upprätthålla en terapeutiskt nivå av läkemedlet under den avsedda behandlingstiden.

Burst definieras som den andel av läkemedlet som absorberas under de första 24 timmarna av den totala andelen som absorberas.

Matematiskt kan man definiera det med hjälp av "area under kurva"-beräkningar från plasmakoncentrationskurvor.

$$Burst = \frac{\int_0^{24h} Cdt}{\int_0^{\infty} Cdt} \cdot 100\%$$

5

Biotillgänglighet

Biotillgänglighet är ett mått på hur stor del av det tillförda läkemedlet som absorberas från administrationsstället till blodet i aktiv form. Biotillgänglighet jämförs ofta med data från intravenös tillförsel av läkemedlet, där man således inte har några absorptionsbarriärer, och kallas då för absolut biotillgänglighet,

Absolut biotillgänglighet definieras enligt följande formel:

15

$$F = \frac{AUC_x \cdot D_{iv}}{D_x \cdot AUC_{iv}}$$

där AUC_x är area-under-kurvan värdet för den undersökta formuleringen, AUC_{iv} är area-under-kurvan värdet för en intravenös tillförsel av läkemedlet, D_x är dosen av läkemedlet i formuleringen och D_{iv} är den intravenösa dosen.

Bestämningen av frisättningsprofilen och de farmakokinetiska parametrarna görs företrädesvis genom djurförsök. Den mest relevanta arten, på grund av sin likhet med människa, är gris. I de fall den biologiskt aktiva substansen kan inducera ett immunsvär under testet som riskerar att påverka bestämningen av de farmakokinetiska parametrarna för den biologiskt aktiva substansen bör hämning av immunsvaret användas, t.ex. genom läkemedelsbehandling, vilket är känt inom teknikområdet, och detaljer kan hämtas ur den vetenskapliga litteraturen, till exempel Agersö et al, (J.Pharmacol Toxicol 41 (1999) 1-8)



Andra intressanta mikropartiklar enligt uppfinningen är sådana som är bionedbrytbara in vitro i närvaro av alfa-amylas och/eller amyloglukosidas.

Ytterligare föredragna mikropartiklar är sådana som
5 är bionedbrytbara och elimineras från vävnad efter subkutan eller intramuskulär administration.

Vad beträffar bestämningen av den biologiska aktiviteten för mikropartiklarna innehållande aktiv substans gäller att denna får ske på ett för varje enskild biologisk substans lämpligt sätt. I de fall bestämningen sker
10 i form av djurförsök, injiceras en viss mängd av den biologiskt aktiva substansen införlivad i stärkelsemikropartiklarna, eventuellt efter upplösning av dessa mikropartiklar enzymatiskt under milda betingelser i förväg och
15 det biologiska svaret jämförs med det svar som erhålles efter injektion av motsvarande mängd av samma biologiskt aktiva substans i en lämplig lösning. I de fall utvärderingen sker in vitro, t ex i provrör eller i cellkultur, görs den biologiskt aktiva substansen helst helt till-
20 gänglig före utvärderingen genom upplösning av stärkelsemikropartiklarna enzymatiskt under milda betingelser, varefter aktiviteten bestäms och jämförs med aktiviteten för en kontrollösning med samma koncentration av ifrågasvarande biologiskt aktiva substans. I alla händelser
25 gäller att utvärderingen skall innefatta eventuella ospecifika effekter av stärkelsemikropartiklarnas nedbrytningsprodukter.

EXEMPEL

30 Uppfinningen kommer nu att belysas ytterligare genom nedanstående icke-begränsande utföringsexempel.

Exempel 1

Procedur för framställning av högkoncentrerat/utfällt hGH
35 lämpligt för immobilisering med PEG.

Till 343 mg hGH sättes 10 mM natriumfosfatbuffert, pH 6,4, till en total volym på 2,5 ml. PEG med en medel-

- molekylvikt på 20000 D löses i samma buffert till en koncentration av 30% under justering av pH till ca 6,4. PEG-lösningen (25 ml) hålls i en bågare med en propeller, varefter temperaturen justeras till 15°C och hGH-
- 5 lösningen (ca 1,25 ml) tillsätts under propelleromrörning och blandningen får stå i 75 min under fortsatt omrörning. Den erhållna suspensionen centrifugeras i en Sorvall SS34 (20 min vid 5000 rpm). Supernatanten sugas av noggrant. Det utfällda proteinet kan tvättas en gång med
- 10 Na-acetat pH 6,4 innehållande 2 mM zinkacetat (10 ml) och den erhållna supernatanten sugas av.

Exempel 2

- Procedur för immobilisering av PEG-solidifierat hGH i
- 15 stärkelsemikrosfärer tillverkade av höggrenad skjuvad stärkelse.

- Stärkelsemikrosfärer tillverkas från skjuvad stärkelse med en medelmolekylvikt på 390 kDa. Stärkelsen löses genom värmning i 10 mM natriumfosfat, pH 6,4, till en
- 20 koncentration av 40% och den erhållna stärkelselösningen tillåts svalna till ca 55°C. Därefter blandas 2,1 g av den erhållna stärkelselösningen med hela den i Exempel 1 framställda satsen av hGH, uppsuspenderad i 10 mM natriumacetatbuffert innehållande 2 mM zinkacetat, pH 6,4, totalt 2,9 ml, under omrörning till en homogen suspension av proteinet i stärkelselösning bildas. Till den erhållna suspensionen sättes 12 g av en PEG-lösning med en koncentration av 42%, där medelmolekylvikten för PEG är 20
- 25 kDa. Solidifieringen initieras vid 4°C i 17 timmar och avslutas vid 37°C i 6 timmar. De erhållna stärkelsemikrosfärerna innehållande hGH tvättas tre gånger med 38 ml 10
- 30 mM natriumacetatbuffert innehållande 2 mM zinkacetat, pH 6,4, och frystorkas. De erhållna mikrosfärerna löses upp med α -amylas och mängden införlivat hGH bestäms, t.ex.
- 35 medelst analys med högtrycksvätskekromatografi. Andelen dimer och polymer bestäms också, t.ex. med högtrycksvätskekromatografi. Utbytet av stärkelsemikrosfärer inne-

hållande hGH är generellt minst 80% och innehållet av hGH, uttryckt som torrsvikt, är kring 15 viktprocent. Proteinets innehåll av dimer är generellt <1% och av polymer <0,1%, vilket visar att proteinet är acceptabelt för parenteral administration på människa.

Exempel 3

Procedur för dragering av stärkelsemikrosfärer innehållande PEG-koncentrerat hGH.

De erhållna hGH-innehållande stärkelsemikrosfärerna från Exempel 2 beläggs med ett frisättningsreglerande hölje av PLGA medelst luftsuspensionsteknik i enlighet med WO97/14408 med användande av en blandning bestående av 75% av RG502H och 25% av RG756 (båda från Boehringer Ingelheim). Efter drageringen löses drageringen upp med en blandning av metylenklorid och aceton i förhållandet 1:3 och efter borttvättande av dessa lösningsmedel, t.ex. genom upprepad centrifugering, löses mikrosfärerna upp med α -amylas. Innehållet av hGH bestäms, t.ex. genom analys med högtrycksvätskekromatografi. Innehållet av dimere och polymer av proteinet bestäms också med samma teknik. Innehållet av protein kan vara kring 11 viktprocent. Den andel av proteinet som föreligger i form av dimere är <2% och av polymer <0,1%. Frisättningskinetiken för hGH från de dragerade mikrosfärerna kan bestämmas in vitro och karakteriseras av frånvaro av en oönskad burst och i övrigt av en kontinuerlig och jämn frisättning med en duration av kring en vecka. Med detta förfarande kan således parenteralt administrerbara mikrosfärer lämpliga för kontrollerad frisättning av hGH framställas.

Exempel 4

Procedur för framställning av högkoncentrerat/utfällt hGH lämpligt för immobilisering med användning av PEG.

Utfällt hGH framställs enligt Exempel 1 med den ändringen att fällningen tvättas i histidinbuffert, pH 4,9.

PATENTKRAV

1. Förfarande för framställning av parenteralt administrerbara mikropartiklar innehållande en biologiskt aktiv substans, vilket innefattar att man

a) bereder en vattenbaserad lösning av den biologiskt aktiva substans som ska införlivas i mikropartiklarna,
b) blandar den i steg a) erhållna lösningen med en vattenbaserad lösning av polyetylenglykol (PEG) under sådana betingelser att den biologiskt aktiva substansen koncentreras och/eller solidifieras,

c) eventuellt tvättar den i steg b) erhållna koncentrerade och/eller solidifierade biologiskt aktiva substansen,

d) blandar den i steg b) eller c) erhållna koncentrerade och/eller solidifierade biologiskt aktiva substansen med en vattenbaserad stärkelselösning,

e) blandar den i steg d) erhållna kompositionen med en vattenbaserad lösning av en polymer med förmåga att bilda ett tvåfas-vattensystem, så att det bildas en emulsion av stärkelsedroppar, vilka innehåller den biologiskt aktiva substansen som inre fas i en yttre fas av nämnda polymerlösning,

f) bringar eller tillåter de i steg e) erhållna stärkelsedropparna att solidifieras till stärkelsemikropartiklar,

g) torkar stärkelsemikropartiklarna från steg f), och

h) eventuellt applicerar ett frisättningsreglerande hölje av en biokompatibel och bionedbrytbar polymer på de torkade stärkelsemikropartiklarna från steg f).

2. Förfarande enligt krav 1, vari steg b) utföres så att solidifieringen av den biologiskt aktiva substansen leder till utfällning av densamma.

3. Förfarande enligt krav 1, vari steg b) utföres så att solidifieringen av den biologiskt aktiva substansen

leder till en högviskös lösning, vilken uppvisar förmåga att bilda vid rumstemperatur hanterbara droppar.

4. Förfarande enligt krav 2 eller 3, vari steg b) utföres till en reversibelt solidifierad aktiv substans.

5 5. Förfarande enligt något av kraven 2-4, vari den solidifierade biologiskt aktiva substansen bildar en pellet eller en högviskös eller fast bottenfas vid centrifugering eller ultracentrifugering.

10 6. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari man i steg d) utnyttjar en vattenbaserad stärkelse-lösning innefattande stärkelse som har ett innehåll av amylopektin överstigande 85 vikt-%, där molekylvikten för nämnda amylopektin är reducerad, företrädesvis genom skjuvning, så att minst 80 vikt-% av materialet ligger
15 inom intervallet 10-10000 kDa.

7. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari man i steg d) utnyttjar en vattenbaserad stärkelse-lösning innefattande stärkelse som har ett aminosyrakväveinnehåll understigande 50 µg per g torrsvikt stärkelse.

20 8. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari den i steg d) använda vattenbaserade stärkelselösningens stärkelsekoncentration är minst 20 vikt-%.

9. Förfarande enligt något av kraven 6-8, vari stärkelsen har en renhet av högst 20 µg, företrädesvis högst
25 10 µg, helst högst 5 µg, aminosyrakväve per g torrsvikt stärkelse.

10. Förfarande enligt något av kraven 6-9, vari stärkelsen har ett innehåll av amylopektin med nämnda reducerande molekylsvikt överstigande 95 vikt-%, företrädesvis överstigande 98 vikt-%.
30

11. Förfarande enligt något av kraven 6-10, vari molekylsvikten för nämnda amylopektin är reducerad så att minst 80 vikt-% av materialet ligger inom intervallet 100-4000 kDa, företrädesvis 200-1000 kDa, allra helst
35 300-600 kDa.

12. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari stärkelsen är sådan att den kan lösas i en koncentration överstigande 25 vikt-% i vatten.

13. Förfarande enligt något av de föregående kraven, 5 vari stärkelsen väsentligen saknar kovalent bundna extra kemiska grupper av det slag som förekommer i hydroxyetylstärkelse.

14. Förfarande enligt något av de föregående kraven, 10 vari stärkelsen har ett endotoxininnehåll understigande 25 EU/g och innehåller mindre än 100 mikroorganismer per gram.

15. Förfarande enligt något av de föregående kraven, 15 vari stärkelsen väsentligen är renad från ytlokaliserade proteiner, lipider och endotoxiner medelst tvättning med vattenbaserad alkalilösning, molekyylviktsreducerad medelst skjuvning och renad från invändiga proteiner medelst jonbyteskromatografi, företrädesvis anjonbyteskromatografi.

16. Förfarande enligt något av kraven 6-15, vari man 20 i steg d) som stärkelse också använder 2-15 vikt-% amylos med en medelmolekylvikt inom intervallet 2,5-70 kDa, företrädesvis 5-45 kDa, där viktprocentandelen är räknat på torrvikt stärkelse.

17. Förfarande enligt något av kraven 8-16, vari man 25 i steg d) bereder en lösning med en stärkelsekoncentration av minst 30 vikt-%.

18. Förfarande enligt något av kraven 6-17, vari man i steg d) bereder en lösning med en stärkelsekoncentration av högst 50 vikt-%, företrädesvis högst 45 vikt-%.

30 19. Förfarande enligt något av kraven 6-18, vari den vattenbaserade stärkelselösningen i steg d) bereds under autoklavering av densamma.

20. Förfarande enligt något av de föregående kraven, 35 vari man i steg d) förenar den aktiva substansen med stärkelselösningen vid en temperatur av högst 60°C, företrädesvis 20-45°C, speciellt 30-37°C.

21. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari man i steg d) bildar en komposition vari viktförhållandet mellan stärkelse och biologiskt aktiv substans ligger inom området från 3:1 till 10000:1.

5 22. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari blandningen i steg e) utföres vid en temperatur inom området 4-50°C, företrädesvis 10-40°C, speciellt 10-37°C.

23. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari blandningen i steg e) utföres med hjälp av minst en
10 statisk mixer.

24. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari man i steg e) sätter polymerlösningen till kompositionen i minst två steg, där minst en av tillsatserna sker efter det att emulsionen har börjat skapas.

15 25. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari man i steg e) som vattenbaserad polymer använder polyetylenglykol.

26. Förfarande enligt krav 25, vari polyetylenglykolen har en medelmolekylvikt av 5-35 kDa, företrädesvis
20 15-25 kDa, speciellt ca 20 kDa.

27. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari man i steg e) bildar stärkelsedroppar vilka ger den för mikropartiklarna önskade storleken, företrädesvis en medelpartikeldiameter, i torrt tillstånd, inom intervallet 10-200 µm, företrädesvis 20-100µm, ännu hellre 20-80µm.
25

28. Förfarande enligt krav 27, vari man efter steg e) tvättar mikropartiklarna, genom filtrering, och eventuellt siktar dem för erhållande av önskad partikelstorleksfördelning.
30

29. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari solidifieringen i steg f) sker vid minst två temperaturer, där inledningen sker vid lägre temperatur än avslutningen.

35 30. Förfarande enligt krav 29, vari solidifieringen inledningsvis sker inom intervallet 1-20°C, företrädesvis 1-10°C, speciellt runt 4°C, och avslutningsvis sker inom

intervallet 20-55°C, företrädesvis 25-40°C, speciellt runt 37°C.

31. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari torkningen i steg g) utföres i form av spraytorkning, frystorkning eller vakuumtorkning, företrädesvis frystorkning.

32. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari man som biologiskt aktiv substans införlivar en substans vald ur den grupp som består av proteiner, peptider, polypeptider, polynukleotider och polysackarider, speciellt rekombinant framställda proteiner.

33. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari appliceringen av det frisättningsreglerande höljet i steg h) utföres medelst luftsuspensionsteknik.

34. Förfarande enligt något av de föregående kraven, vari det frisättningsreglerande höljet i steg h) bildas av en homo- eller sampolymer innehållande alfa-hydroxisyraenheter.

35. Förfarande enligt krav 34, vari alfa-hydroxisyran är mjölksyra och/eller glykolsyra.

36. Mikropartiklar lämpade för parenteral administration, företrädesvis via injektion, på ett däggdjur, speciellt människa, och innehållande en biologiskt aktiv substans, vilka väsentligen består av parenteralt administrerbar bionedbrytbar stärkelse som matris, vilken innehåller den biologiskt aktiva substansen i väsentligen icke-kemiskt komplexbunden form och i form av fasta partiklar med en medelstorlek inom området 0,05-30µm.

37. Mikropartiklar enligt krav 36, vari den biologiskt aktiva substansen är en utfälld substans.

38. Mikropartiklar enligt krav 36 eller 37, vari partiklarna av den biologiskt aktiva substansen har en medelstorlek inom området 0,2-10µm, företrädesvis 0,5-5µm, ännu hellre 1-4µm.

39. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-38, vari stärkelsen har ett innehåll överstigande 85 vikt-%

av amylopektin, för vilket minst 80 vikt-% har en medelmolekylvikt inom intervallet 10-1000 kDA.

40. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-39, vari stärkelsen har ett aminosyrakväveinnehåll understigande 50 µg per gram torrsvikt stärkelse och vilka saknar kovalent kemisk tvärbinding mellan stärkelsemolekylerna.

41. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-40, vari stärkelsen är sådan som definieras i något av förfarandekraven 6-16.

42. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-41, vilka har ett frisättningsreglerande hölje erhållet eller bildat enligt definitionen i något av förfarandekraven 33-35.

43. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-42, vari den biologiska substansens bioaktivitet är minst 80%, företrädesvis minst 90% och helst väsentligen bibehållen, jämfört med den bioaktivitet som substansen uppvisade innan den införlivades i stärkelsen.

44. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-43, vilka är bionedbrytbara in vitro i närvaro av alfa-amylas och/eller amyloglukosidas.

45. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-44, vilka är bionedbrytbara och elimineras från vävnad efter subkutan eller intramuskulär administration.

46. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-45, vari den biologiskt aktiva substansen är vald ur den grupp som består av proteiner, peptider, polypeptider, polynukleotider och polysackarider.

47. Mikropartiklar enligt krav 46, vari proteinet är ett rekombinant framställt protein.

48. Mikropartiklar enligt krav 46 eller 47, vari proteinet är valt bland tillväxthormoner, kolonistimulerande faktorer, erytroproteiner, interferoner och vacciner.

49. Mikropartiklar enligt krav 48, vari proteinet är ett tillväxthormon.

50. Mikropartiklar enligt krav 49, vari tillväxthormonet är humant tillväxthormon (hGH).

51. Mikropartiklar enligt något av kraven 36-50, vari innehållet av tvåvärda metalljoner är sådant att
5 molförhållandet totala metallkatjoner: biologiskt aktiv substans är mindre än 0,2:1, företrädesvis mindre än 0,1:1, ännu hellre mindre än 0,01:1.

52. Mikropartiklar enligt krav 51, vari de angivna molförhållandena gäller för zink som nämnda metall.

10 53. Mikropartiklar enligt något av kraven 50-52, vari det humana tillväxthormonets innehåll av dimerer är <2 vikt-%, företrädesvis <1 vikt-% och av polymerer <0,2 vikt-%, företrädesvis <0,1 vikt-%.

15 54. Mikropartiklar enligt något av kraven 50-53, vari frisättningskinetiken för hGH bestämd in vitro karaktäriseras av i huvudsak kontinuerlig och jämn frisättning under minst en vecka.

55. Mikropartiklar, vilka är framställningsbara medelst ett förfarande enligt något av kraven 1-35.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
0

SAMMANDRAG

Förfarande för framställning av mikropartiklar innehållande biologiskt aktiv substans, vid vilket man bereder en vattenbaserad lösning av nämnda substans, blandar denna lösning med en vattenbaserad lösning av PEG så att substansen koncentreras och/eller solidifieras, eventuellt tvättar substansen, blandar substansen med en vattenbaserad stärkelselösning, blandar den komposition som erhålles efter tillsats av stärkelselösningen med en polymerlösning, så att det bildas en emulsion av stärkelsedroppar i polymerlösningen, låter stärkelsedropparna solidifieras till mikropartiklar, torkar mikropartiklarna och eventuellt applicerar ett frisättningsreglerande hölje på dessa.

Nya mikropartiklar framställningsbara medelst detta förfarande.